

Artigo / Article

ZAP-70: Aspectos práticos

ZAP-70: Practical aspects

Mihoko Yamamoto

A ZAP-70 é uma proteína kinase normalmente expressa nos linfócitos T e células NK, mas ausente nos linfócitos B. No entanto, ela está expressa nas células B de pacientes com LLC que não apresentam mutação nos genes da região variável da cadeia pesada de imunoglobulina (genes *IgVH*). Além disso, observa-se que a expressão da ZAP-70 é estável nestes pacientes ao longo do tempo, diferentemente da expressão de CD38, outro marcador considerado de prognóstico nesta doença. Estudos têm sido realizados para validá-la como marcador "surrogate" para o estado de mutação dos genes *IgVH* (um forte fator de prognóstico), uma vez que a sua avaliação molecular é laboriosa e demorada. O método mais rápido e simples para avaliar a expressão da ZAP-70 é através da citometria de fluxo utilizando-se anticorpos monoclonais já disponíveis no mercado. O primeiro produto comercial (clone 2F3.2 da marca Upstate) é puro, não conjugado com fluorocromos, o que torna o ensaio laborioso, apesar de resultados consistentes. Rapidamente surgiram outros Ac conjugados com fluorocromos (com FITC da própria Upstate, ou Alexa-fluor, FITC ou PE da Caltag) e estudos estão sendo realizados para a sua validação técnica. Rev. bras. hematol. hemoter. 2005;27(4):236-240.

Palavras-chave: ZAP-70; LLC; prognóstico.

Introdução

O gene *ZAP-70*, localizado no braço curto do cromossomo 2, codifica uma proteína tirosino kinase de 70kDa, essencial na transdução da sinalização nos linfócitos T e células *natural killer* (NK). Essa proteína intracelular encontra-se associada à cadeia ζ do complexo receptor de células T (TCR)/CD3, de onde vem o seu nome ZAP (*zeta associated protein*).¹ Normalmente as células B não expressam ZAP-70, com exceção de uma subpopulação B com fenótipo ativado no baço e na tonsila,² e a proteína correspondente, uma Syk, encontra-se associada ao CD79b do complexo receptor de células B (BCR)/D79a/79b.¹

Estudos recentes de análise do perfil de expressão gênica através de técnicas de *microarray* de cDNA nas células de leucemia linfocítica crônica (LLC) revelaram que os linfócitos B leucêmicos de parte dos pacientes expressa-

vam ZAP-70.^{3,4,5} (Figura 1)⁵ Além disso, a expressão dessa proteína era distinta conforme o estado de mutação somática dos genes *IgVH*: pacientes com LLC *IgVH* mutados não expressavam ZAP-70, ao contrário dos casos com *IgVH* não-mutados, onde a expressão era de forte intensidade na grande maioria.⁶

Nas células B da LLC, a ZAP-70 parece ser recrutada para o complexo BCR e, de forma ainda não esclarecida, aumenta a sinalização do BCR levando à fosforilação das proteínas citosólicas.⁷

Desde então, a ZAP-70 atraiu interesse dos investigadores em LLC, pela possibilidade de ser um marcador substituto para avaliação do estado de mutação dos genes *IgVH*, considerado um forte fator de prognóstico nesta doença. De fato, apesar de a concordância não ser total, estudos subsequentes comprovaram alta correspondência entre a alta expressão da ZAP-70 e o estado não mutado

Disciplina de Hematologia e Hemoterapia – Universidade Federal de São Paulo – Unifesp-EPM.

Correspondência para: Mihoko Yamamoto
Disciplina de Hematologia e Hemoterapia
Rua Botucatu, 740, 3º andar – Vila Clementino
04023-900 – São Paulo-SP
Fone : (11) 5579 1550; FAX : (11) 5571 8806
E-mail: yamamoto@hemato.epm.br

IgVH.^{4,8,9} Estudos recentes mostram essa concordância em cerca de 71% dos casos não mutados e em 17% dos casos mutados.¹⁰

A análise dos genes *IgVH* envolve métodos moleculares laboriosos que demandam longo tempo, inviabilizando a sua aplicação na prática clínica de condução dos pacientes. Avaliação da expressão da ZAP-70, em contraste, pode ser realizada com uso de anticorpo monoclonal (AcMo) específico através de técnicas imunológicas como *immunoblotting*, imunistoquímica e, principalmente, a citometria de fluxo, um método altamente sensível e de execução fácil e rápida. Em adição, diferentemente do comportamento da expressão do CD38, um outro marcador que tem sido relacionado ao prognóstico,^{11,12} a expressão do ZAP-70 parece permanecer estável ao longo da evolução.

Métodos de estudo da ZAP-70

O gene *ZAP-70* tem sido estudado através de técnicas moleculares a partir da extração de RNA, transformação

para cDNA, amplificação por RT-PCR e, atualmente, a sua quantificação pode ser feita através de RQ-PCR.⁷

Para avaliação da proteína ZAP-70, estudos podem ser realizados com a técnica de *immunoblotting* para identificar e quantificar a proteína intracelular ZAP-70.⁹ Resumidamente, as células são lisadas em solução tampão contendo SDS, Tris HCl e glicerol, e as proteínas fracionadas através da eletroforese em gel com SDS e transferidas em membrana de nitrocelulose. A identificação da ZAP-70 é feita através do uso de AcMo.⁸

Outro método é a imunistoquímica com aplicação do Ac Mo em cortes histológicos de linfonodo e avaliação da expressão da ZAP-70 nas células leucêmicas, tendo como controle positivo os linfócitos T. No entanto, pela facilidade técnica e rapidez na obtenção dos resultados, a maioria dos estudos utiliza hoje a técnica da citometria de fluxo. Inicialmente, o anticorpo disponível era o do clone 2F3.2 (Upstate, Biotechnology), puro sem conjugação com fluorocromos.

Em virtude desta proteína estar presente também nos linfócitos T e células NK, ao estudar a expressão da ZAP-

70 pela citometria de fluxo, deve-se sempre acrescentar marcadores destas células juntamente com o marcador de células B, alvo do estudo, além de um controle negativo. Assim, habitualmente após as células serem permeabilizadas e fixadas, são preparados dois tubos contendo: tubo A) células + Ac isotipo não conjugado (tubo controle) e o tubo B) células + Ac ZAP-70 não conjugado. Após incubação por 30 minutos à temperatura ambiente, e as células lavadas, o segundo anticorpo anti-Ig de camundongo/FITC é colocado e incubado por trinta minutos adicionais. Após lavagem, as células são incubadas com Ac puro ou soro de camundongo a 5% durante 30 minutos e novamente lavadas. Finalmente, as células são marcadas com os AcMo identificadores dos linfócitos (CD19/PE, CD3/PerCP) por 15 minutos (Quadro 1). A leitura e análise são realizadas em citômetro de fluxo (Figura 2) e a maioria dos estudos considera reação positiva para ZAP-70 quando 20% ou mais das células expressarem essa proteína.

Novos AcMo anti-ZAP-70 foram produzidos estando atualmente disponíveis no mercado produtos conjugados com fluorocromos, facilitando tecnicamente a realização dos ensaios (Quadro 2). Nestes casos, as marcações

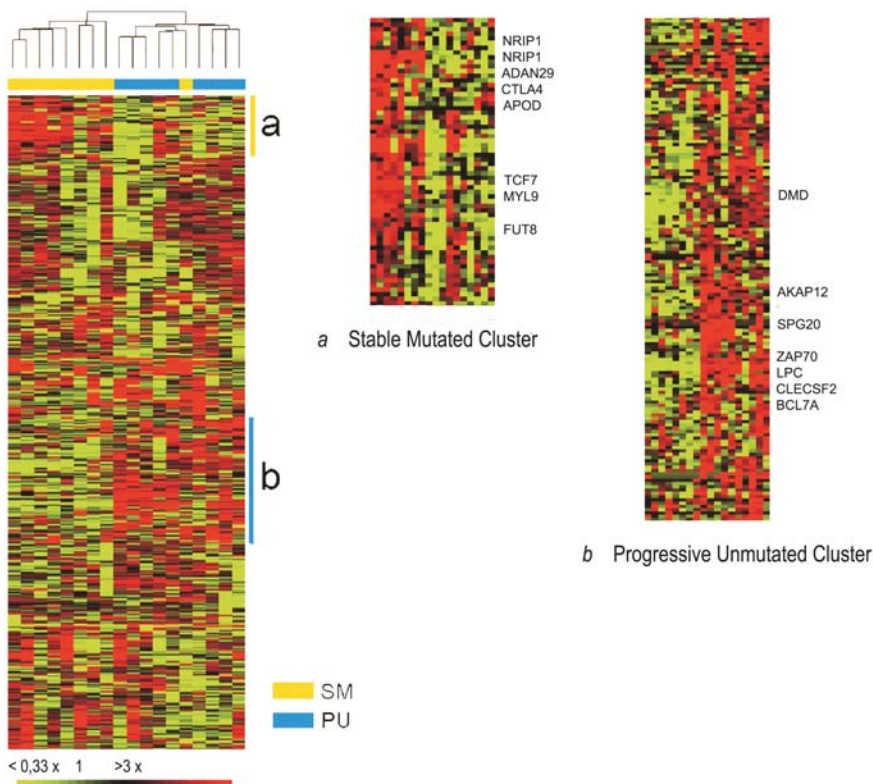


Figura 1. Perfil de expressão gênica na LLC: análise não-supervisionada de 18 casos. O painel à esquerda apresenta um grupo de 840 genes com expressão diferencial entre casos de LLC mutados (SM) e não-mutados (PU). O painel central corresponde a um grupo de genes predominantemente e homogêaneamente expressados nos casos SM (a), enquanto que o painel da direita refere-se aos casos PU (b). As cores verde e vermelha representam, respectivamente, uma baixa e alta expressão gênica em relação à mediana de todas as amostras analisadas. Nota-se, entre os casos PU, uma hiperexpressão do gene ZAP-70. (utilização da figura autorizada pelo Dr Yuri Vasconcelos⁵)

são realizadas em apenas uma etapa, após permeabilização das células (Quadro 3). Outros métodos podem ser testados para avaliar a expressão da ZAP-70, como a citometria de fluxo quantitativa, em que a quantidade de molécula da proteína por célula é avaliada através do cálculo da equivalência de fluorescência usando-se *beads* marcados. (*Quantum FITC molecules of equivalent soluble fluorochrome - MESF- beads*).¹³

Quadro 1
Marcação das células com utilização de AcMo ZAP-70 puro

Tubos	1ª etapa	2ª etapa	3ª etapa	4ª etapa
A	Células* + IgG2/NC (1,0x10 ⁶) (2,0 µg)	Anti-IgM/FITC	CD4/NC	CD19/PE + CD3/PerCP
B	Células* + ZAP-70/NC (1,0x10 ⁶) (2,0 µg)	Anti-IgM/FITC	CD4/NC	CD19/PE + CD3/PerCP

* células fixadas (paraformaldeído) e permeabilizadas (solução de saponina); NC não conjugado

Quadro 2
Principais anticorpos ZAP-70 disponíveis no mercado e já testados

AcMo / fabricante	Clone	Fluorocromo conjugado
ZAP-70 - Upstate Biotechnology (EUA)	2F3.2	- Puro (não conjugado) - Conjugado com FITC
ZAP-70 - Caltag Laboratories (EUA)	1E7.2	- Alexa Flúor 488 - FITC - PE

Outros encontram-se em fase de teste (ex. marca BD conjugado com FITC)

Quadro 3
Marcação das células com utilização de Ac ZAP-70 conjugado com Alexa-flúor

Tubos	1ª. etapa	2ª. etapa	3ª. etapa
A	Células (1,0x10 ⁶) + CD19/PE + CD3/PerCP	permeabilização	IgG1/FITC
B	Células (1,0x10 ⁶) + CD19/PE + CD3/PerCP	permeabilização	ZAP-70/Alexa-flúor (1,25 l)

ZAP-70: Clone 1E7.2 (Caltag)TC)

Comparação de anticorpos e métodos para citometria de fluxo

Com o aparecimento de novas opções de reagentes, estudos comparativos têm sido realizados na tentativa de validar os diferentes AcMo, bem como os reagentes de fixação e permeabilização. Os resultados são preliminares, variando de acordo com o grupo (método) de estudo, e no momento ainda não há um consenso sobre qual o melhor anticorpo para avaliar ZAP-70 nas LLC. O Ac da Caltag/Alexa-fluor foi comparado com o da Upstate/puro não-conjugado e os resultados mostraram boa correlação quando se utilizou o reagente comercial Fix & Perm® (Caltag Laboratories) para fixação e permeabilização das células.¹⁴

No entanto, essa correlação não foi observada quando a fixação e permeabilização celular foram realizadas com o método paraformaldeído/metanol. Além disso, com este método houve importante coloração de fundo e reação inespecífica do anticorpo da Caltag, exigindo maior atenção do operador.

Outro grupo, em estudo multicêntrico, avaliando 181 pacientes com LLC, comparou os Ac dos dois fabricantes (puro e conjugados com FITC, Alexa-fluor, PE) e também avaliou o método de interpretação, utilizando porcentagem de positividade e a razão da intensidade de fluorescência média (MCF) em relação à célula T (controle positivo).¹⁵ Foram considerados os valores de corte >20% e R<4, respectivamente, para expressão positiva da ZAP-70. Maior discordância entre os resultados obtidos com o uso de anticorpo 2F2.3 conjugado com PE eos obtidos pela técnica de Western Blot ou pela RQ-PCR, foi observada, podendo levar a um risco de resultados falso-positivos. Por outro lado, resultados falso-negativos também foram observados com o Ac 1E7.2 conjugado com Alexa-fluor. Assim, sugere-se a necessidade de maiores estudos para validação dos métodos que utilizam Ac conjugados.

Outro interesse é avaliar a concordância entre a expressão da ZAP-70 e o estado mutacional dos genes *IgVH*. Estes autores encontraram discordância entre a expressão da ZAP-70 e o estado mutacional de *IgVH* em cerca de 20% dos casos. Estudos de Orchard et al¹⁶ mostram que ambos os AcMo clone 2F3.2/não conjugado e clone 1E7.2/Alexa-flúor 488 apresentam boa concordância com o estado de mutação de *IgVH*, e quando se utilizou a razão da média geométrica ZAP-70/controlou houve menor variabilidade interobservadores.

Ainda neste estudo a comparação entre os anti-coagulantes utilizados na coleta da amostra revelou que amostras em heparina apresentavam leve declínio da expressão da ZAP-70 com o tempo (D1 a D2) e, por outro lado, em EDTA apresentavam um aumento da expressão quando avaliada 24 horas após (D1). A questão requer mais estudos para a definição do melhor reagente.

A expressão da ZAP-70 na LLC parece permanecer estável ao longo da evolução da doença., o que a torna um marcador importante para prever o estado de mutação do *IgVH* e o prognóstico de um determinado paciente com

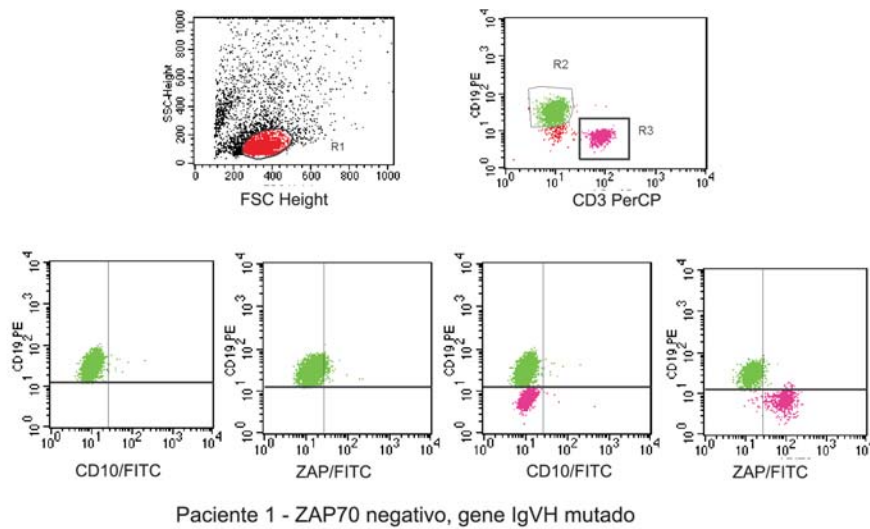


Figura 2. (a) Gráficos em dot plot da expressão da ZAP-70 (clone 2F3.2–Upstate) em citometria de fluxo de um paciente da Unifesp com LLC, *IgVH* mutado

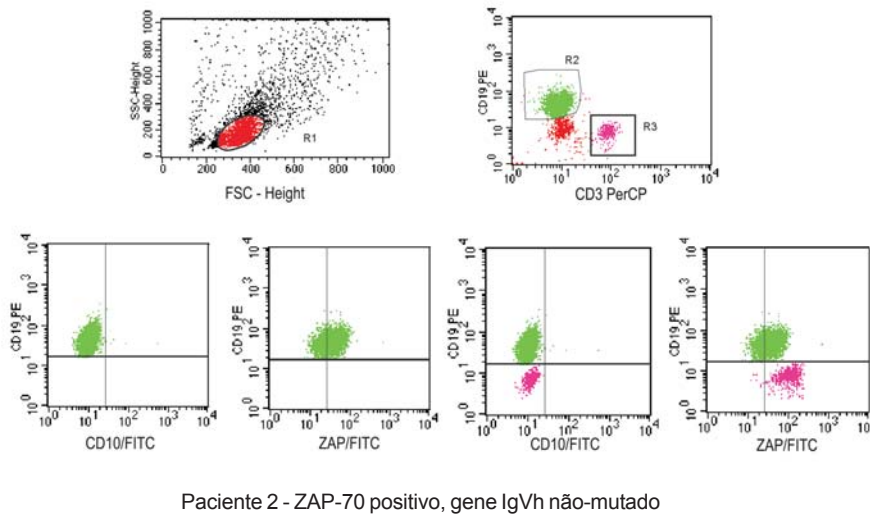


Figura 2. (b) Gráficos em dot plot da expressão da ZAP-70 (clone 2F3.2–Upstate) em citometria de fluxo de um paciente da Unifesp com LLC, *IgVH* não-mutado

LLC. Estudos recentes corroboram a estabilidade da ZAP-70 na maioria dos pacientes.^{17,10,18} Há, no entanto, uma pequena variação na percentagem de expressão da ZAP em parte dos pacientes e em apenas cerca de 13% deles esta diferença foi maior que 10%. Além disso, o resultado alterado atravessou o limite de corte em relação ao valor anterior em menos de 10% dos casos, não interferindo, assim, de modo significativo na interpretação do prognóstico estabelecido ao diagnóstico.^{16,17} Mesmo em estudo com casuística maior e avaliação por maior tempo de acompanhamento (33 a 102 meses) observa-se que apenas 8% (9/111) dos pacientes apresentaram variação na expressão de ZAP-70 a ponto de atravessar o nível de corte de 20%.

Observou-se ainda que cinco dos nove pacientes haviam recebido tratamento e que a alteração não teve relação com a progressão clínica da doença.¹⁸

Conclusões

Em resumo, conclui-se que o nível de expressão da ZAP-70 é útil na avaliação do prognóstico em pacientes com LLC, considerando a maioria dos investigadores o valor limite de corte de 20% para reação positiva. Resultados em canal médio de fluorescência (MCF) podem também ser utilizados. Dos diferentes métodos de estudo, a citometria de fluxo é de fácil realização, sensível e permite a obtenção rápida dos resultados. A expressão da ZAP-70 pode apresentar pequena variação dependendo do método utilizado e, em menos de 10% dos pacientes, pode sofrer alteração no decorrer da evolução. O AcMo da Upstate (clone 2F3.2) não conjugado e o da Caltag (clone 1E7.2) conjugado com Alexa-fluor têm mostrado resultados confiáveis em nossas mãos. Os produtos conjugados com outros fluorocromos, ou de outros fabricantes estão em vias de validação e devem ser utilizados com cautela e após validação técnica no próprio laboratório. Para a fixação e permeabilização celular, os reagentes comerciais, Fix & Perm® (Caltag) e Intraprep® (Coulter Immunotech), bem como a solução paraformaldeído/saponina podem ser utilizados com boa resolução.

Recomendações

1. Expressão de ZAP-70 é um fator de prognóstico na LLC.
2. A citometria de fluxo é o método útil (sensível, fácil e rápido) para avaliar a expressão da proteína ZAP-70).
3. Os anticorpos monoclonais da Upstate (clone 2F3.2) não conjugado e da Caltag (clone 1E7.2) conjugado com Alexa-fluor podem ser utilizados.
4. Outros anticorpos monoclonais anti-ZAP-70, bem como os métodos de permeabilização e análise, devem ser utilizados com precaução e devem ser validados antes da sua introdução na rotina do laboratório.

Abstract

ZAP-70 is a 70Kd protein kinase present in normal T Lymphocytes and natural killer cells (NK), but absent in normal B lymphocytes. Nevertheless, B cells in some B-cell Chronic Lymphocytic Leukemia (CLL) patients express ZAP-70 and it has been found to be associated with the unmutated status of immunoglobulin heavy chains (IgVH) genes, a strong prognostic factor in CLL. In addition, the ZAP-70 expression in CLL cells is stable over time, differently to the CD38 expression, another prognostic marker in CLL. Several studies have been performed to validate the ZAP-70 expression as a surrogate marker for the IgVH mutation status which uses a laborious and time consuming technique. Using monoclonal antibodies, anti-ZAP-70 is easily detected by a rapid and sensitive flow cytometric technique. Upstate Biotechnology developed the first unconjugated antibody (2F3.2 clone) and soon after other products were developed, including fluorochrome conjugated ones, facilitating the technical assays. ZAP-70 can be evaluated by flow cytometric methods and its expression predicts the prognosis in the great majority of CLL cases. Rev. bras. hematol. hemoter. 2005;27(4):236-240.

Key words: ZAP-70, CLL, prognosis

Referências Bibliográficas

1. Chan AC, Iwashima M, Turck CW, Weiss A. ZAP-70: a 70kD protein-tyrosine kinase that associates with the TCR zeta chain. Cell 1992;71:649-62.
2. Nolz JC, Tschumper RC, Pittner BT et al. ZAP-70 is expressed by a subset of normal human B-lymphocytes displaying a activated phenotype. Leukemia 2005;19:1.018-24.
3. Rosenwald A, Alizadeh AA, Widhopf G et al. Relation of gene expression phenotype to immunoglobulin mutation genotype in B cell chronic lymphocytic leukemia. J Exp Med 2001;194:1.639-47.
4. Wiestner A, Rosenwald A, Barry TS et al. ZAP-70 expression identifies a chronic lymphocytic leukemia subtype with unmutated immunoglobulin genes, inferior clinical outcome and distinct gene expression profile. Blood 2003;101:4.944-51.
5. Vasconcelos Y, De Vos J, Vallat L et al. Gene expression profiling of chronic lymphocytic leukemia can discriminate cases with stable disease and mutated Ig genes from those with progressive disease and unmutated Ig genes. Leukemia online publication 25 August 2005.
6. Crespo M, Bosch F, Vilhamor N et al. ZAP-70 expression as a surrogate for immunoglobulin-variable-region mutations in chronic lymphocytic leukemia. N Engl J Med 2003;348:1.764-75.
7. Chen L, Widhopf G, Huynh L et al. Expression of ZAP-70 is associated with increased B-cell receptor signaling in chronic lymphocytic leukemia. Blood 2002;100:4.609-14.
8. Orchard JA, Ibbotson RE, Davis Z et al. ZAP-70 expression and prognosis in chronic lymphocytic leukemia. Lancet 2004;363:105-11.
9. Kim S-Z, Chow KU, Kukoc-Zivojnov N et al. Expression of ZAP-70 protein correlates with disease stage in chronic lymphocytic leukemia and is associated with, but not generally restricted to, non-mutated IgVH status. Leuk & Lymphoma 2004;45:2.037-45.
10. Rassenti LZ, Huynh L, Toy TL et al. ZAP-70 compared with immunoglobulin heavy-chain gene mutation status as a predictor of disease progression in chronic lymphocytic leukemia. N Engl J Med 2004;351:893-901.
11. Damle RN, Wasil T, Fais F et al. IgVH gene mutation status and CD38 expression as novel prognostic indicators in chronic lymphocytic leukemia. Blood 1999;94:1.840-7.
12. Hamblin TJ, Orchard JA, Ibbotson RE et al. CD38 expression and immunoglobulin variable region mutations are independent prognostic variables in chronic lymphocytic leukemia, but CD38 expression may vary during the course of the disease. Blood 2002;99:1.023-29.
13. Herishanu Y, Kay S, Rogowski O et al. T-cell ZAP-70 overexpression in chronic lymphocytic leukemia (CLL) correlates with CLL cell ZAP-70 levels, clinical stage and disease progression. Leukemia 2005;19:1.289-91.
14. Gibbs G, Bromidge T, Howe D et al. Comparison of flow cytometric methods for the measurement of ZAP-70 expression in a routine diagnostic laboratory. Clin Lab Haematol 2005;27:258-66.
15. Le Garff-Tavernier M, Letestu R, Ticcioni M et al. Multicentric finalization of ZAP-70 quantification by a flow cytometric technique. Leuk & Lymphoma 2005;46:S44.
16. Orchard JA, Best OG, Ibbotson RE, Oscier DG. ZAP-70 by flow cytometry: a comparison of different antibodies, anticoagulants, and methods of analysis. Leuk & Lymphoma 2005;46:S50.
17. Schroers R, Griesinger F, Trümper L et al. Combined analysis of ZAP-70 and CD38 expression as a predictor of disease progression in B-cell chronic lymphocytic leukemia. Leukemia 2005;19:750-8.
18. Villamor N, Crespo M, Bosch F et al. ZAP-70 expression remains stable during the course of chronic lymphocytic leukemia. Leuk & Lymphoma 2005;46:S43.

Avaliação: Carlos Sergio Chiattoni

(publicado após acordo do Editor)

Conflito de interesse: Artigo derivado do II Encontro Brasileiro de Consenso da LLC

Recebido: 30/10/2005

Aceito: 15/11/2005